

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-149096

(P2003-149096A)

(43) 公開日 平成15年5月21日 (2003.5.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 1/10		G 0 1 N 1/10	B 2 G 0 4 5
			V 2 G 0 5 2
A 6 1 M 1/02	5 4 0	A 6 1 M 1/02	5 4 0 4 C 0 7 7
1/34	5 0 0	1/34	5 0 0 4 D 0 0 6
B 0 1 D 69/02		B 0 1 D 69/02	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-342484 (P2001-342484)

(22) 出願日 平成13年11月7日 (2001.11.7)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年5月7日  
 社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集 50巻  
 4号」に発表

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 田中 賢

北海道札幌市北区北8条西5丁目 北海道  
大学内

(72) 発明者 下村 政嗣

北海道札幌市北区北8条西5丁目 北海道  
大学内

(74) 代理人 100085109

弁理士 田中 政浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液濾過膜および方法

(57) 【要約】

【課題】 微量の全血から血清あるいは血漿、血球、さらには白血球を短時間で取得する方法を提供する。

【解決手段】 上記課題は、孔径が0.5~40 $\mu$ mで、孔径のバラツキが変動係数20%以下の膜からなる血液濾過膜と、同一の平均孔径の膜あるいは異なる平均孔径の膜を2枚以上用いることによる血液濾過方法によって解決される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 孔径が0.5～40 $\mu$ mで、孔径のバラツキが変動係数20%以下の膜からなる血液濾過膜

【請求項2】 ハニカム様構造を有する請求項1に記載の血液濾過膜

【請求項3】 ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンを主とする物質からなる請求項1または請求項2に記載の血液濾過膜

【請求項4】 請求項1～請求項3のいずれかに記載の、同一の平均孔径の膜あるいは異なる平均孔径の膜を2枚以上用いることによる血液濾過方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、全血から血球を除去するための濾過膜、およびその濾過膜を用いて全血から赤血球あるいは白血球を捕捉して回収する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血液中の構成成分例えば代謝産物、蛋白質、脂質、電解質、酵素、抗原、抗体などの種類や濃度の測定は、通常全血を遠心分離して得られる血清または血漿を検体として行われている。しかし、遠心分離には手間と時間を要し、特に少数の検体を急いで処理したいときあるいは現場検査などには、電気を動力として遠心分離機を必要とする遠心分離法は不向きである。そこで、濾過により全血から血清あるいは血漿を分離回収する方法が検討されてきた。

【0003】濾過によって全血から血清あるいは血漿を得る方法には、富士写真フイルム(株)製の「プラズマフィルターPF」として市販され、特開平2000-81432号公報で知られているように、3～6枚のガラス繊維濾紙をプラスチック製のホルダーに装填して、吸引により全血を濾過する方法がある。しかし、この濾過方法では、血漿を150 $\mu$ L程度濾過できるものの全血を3mL程度必要とし、微量の全血を濾過することができない。

【0004】濾過によって全血から血球を捕捉し、血清あるいは血漿を得る方法には、特開平10-185910号公報に記載された3次元多孔質体を用いる方法があり、ポリスルホン膜、酢酸セルロース膜などが知られている。しかし、この膜は孔径を均一に作成するのは難しい。

【0005】一方、全血から白血球を捕捉して採取し、これをもとに遺伝子を回収して遺伝子解析あるいは遺伝子診断に用いることが、近年盛んに行われるようになってきており、全血から白血球を回収する技術が必要となってきた。

【0006】全血から白血球のみを除去する方法には、テルモ(株)社製の「イムノガード(登録商標)III-RC」で実用化されているポリウレタン多孔質フィルター、日本ボール(株)社で販売している「ボール輸血フィ

ルターPL1J」で実用化されているポリエステルフィルターなどが知られている。しかし、このフィルターは輸血用の全血から白血球を除去するためのものであり、微量の全血から白血球を捕捉して白血球を回収することが難しい。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】新生児など微量の全血しか採血できない場合など、微量の全血から血清あるいは血漿を急いで得る方法が求められている。また、濾過によって全血から血球を捕捉する方法において、遺伝子診断等に用いるために白血球のみを分画して採取する方法が求められている。

【0008】

【課題を解決するための手段】均一な孔径の薄い膜を用いることで、微量の全血から血球のみを捕捉して血清あるいは血漿を回収することができると、および均一な孔径の大きさによって全血の白血球のみを捕捉して回収できることを見出した。

【0009】

【発明の実施の態様】膜の素材としては、ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトン、ポリ-3-ヒドロキシブチレート、アガロース、ポリ-2-ヒドロキシエチルアクリレート、ポリスルホンなどの非水溶性溶媒に溶解する高分子化合物を用いることができるが、ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンを用いることが好ましい。

【0010】これらの素材だけでもハニカム様の構造の膜を形成させることができるが、両親媒性の素材を添加することが好ましい。両親媒性の素材としては、例えば両親媒性ポリアクリルアミドがある。

【0011】膜の素材と両親媒性の素材の混合比率は、重量比0:1～1:0の範囲で使用することが好ましい。より好ましくは、重量比5:1～20:1の範囲である。

【0012】キャストする溶媒としては、クロロホルム、ジクロロメタン、四塩化炭素、シクロヘキサンなど膜の素材となる高分子化合物を溶解させることができる非水溶性の溶媒であればよい。キャストするときのポリマー濃度は、高分子膜を形成できる濃度であればよく、工業的に大量生産をするためには、0.1wt%以上のできる限り高い濃度で製膜することが望ましい。

【0013】非水溶性の膜の素材、例えばポリ- $\epsilon$ -カプロラクトン、非水溶性の溶媒、例えばクロロホルムに溶解させているので、高湿度空気によって溶媒を蒸発させるときに気化熱により空気中の水分が結露し、それが溶媒の蒸発とともに徐々に成長して直径0.5～40 $\mu$ m程度のサイズの水滴になる。この水滴には非水溶性のポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンは溶解できないから、この部分が孔(ポア)となった膜が得られる。例えばシャーレに2次元的にキャストしているので、成長した水滴は、球の2次元的最密充填構造様に規則正しく配列し、

結果としてハニカム構造の膜が得られる。

【0014】孔径は、キャストする液の濃度及び液量を調節してシャーレ等の支持層に供給し、雰囲気あるいは吹き付ける空気温度、湿度を制御することで、溶媒の蒸発スピード、結露スピードを制御することによって、制御することができる。更に、微量の界面活性剤を添加して水滴の融合を抑えて安定化させることによって、より規則正しいハニカム構造の膜を作成することができる。

【0015】膜に吹き付ける高湿度空気は、相対湿度30%および80%のものを主に用いたが、膜の表面に空気中の水分を結露させることができる湿度であればよく、温度によって20~100%の相対湿度であればよいし、空気に限らず窒素、アルゴンなどの比較的不活性なガスを用いてもよい。

【0016】膜に吹き付ける高湿度空気の流量は、膜の表面に空気中の水分を結露させることができ、キャストに用いた溶媒を蒸発させることができる流量であればよい。

【0017】高湿度空気を吹き付けるときの雰囲気の温度は、キャストに用いた溶媒が蒸発することができる温度であればよく、実験室レベルでは15~32℃、生産レベルでは5~80℃の温度であることが望ましい。

【0018】キャストする溶液の濃度、溶液の量、溶媒の種類、吹き付ける空気の相対湿度・温度・流量を変えることによって、結露、水滴の成長、溶媒の蒸発速度を制御し、様々な孔径の規則正しいハニカム様の構造の膜を得ることができ、血液中の成分である、直径約3μmの血小板、直径約15μmの白血球、変形能が大きい直径約7μmの赤血球を、孔径のサイズを変えることにより各々を分離できるフィルターとして使用できる。

【0019】また、孔径のほぼ等しい膜を積層することによって、フィルターとして分離できる能力を高めることができる。更に、孔径の異なる複数の膜を積層することによって、幾つかの生体物質を同時に分離する或いは分画することができる。例えば、孔径5.5~8.5μmの膜と孔径3.5μm以下の膜を積層して孔径の大きい膜側から全血を供給することによって、孔径の大きい膜で白血球を捕捉し、孔径の小さい膜で赤血球を捕捉することが同時に達成できる。

【0020】更に、孔径をサブミクロンオーダーに設定することで、透析などの血液浄化に代表されるような標的物質の選択的分離回収技術としての期待ができる。

【0021】本発明においてハニカム様構造とは、孔径がほぼ一定の複数の孔が規則正しく配列し、このような孔が膜を貫通している構造をいう。孔の断面に特に限定は無く、円形、楕円形、六角形、長方形、正方形等の形状でよい。

【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

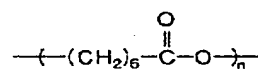
#### 【0023】実施例1 ハニカム様構造の膜の作成(1)

平均分子量7万~10万のポリ-ε-カプロラクトン(化合物1)と両親媒性ポリアクリルアミド(化合物2)を重量比で10:1の割合で混合したクロロホルム溶液(ポリマー濃度として0.1~2wt%)を、直径10cmのシャーレ上に5mLキャストし、相対湿度30~80%の高湿度空気を毎分1~20Lの流量で吹き付け、クロロホルム溶媒を蒸発させることによって、柔軟性、弾性を有し、力学強度の強いハニカム様構造の膜を得た。

【0024】

【化1】

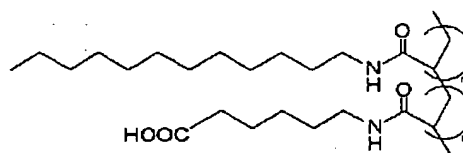
化合物1



【0025】

【化2】

化合物2



(m:n=4:1)

【0026】上記の様々な条件で作成した膜の構造を、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡で観察したところ、0.5~40μmの孔径のハニカム様の構造の膜であり、表面から裏面へ単一層の孔で貫通している構造であった。孔径はキャストした全面にわたってきれいな円形をしており、サイズもほぼ同一であった。撮影した写真から孔径を計測し、孔径の分布を求めると変動係数でCV10%以下であることがわかった。また、レーザーを用いた光散乱の評価でキャストした膜全面にわたって10以上の回折光が観測できたことから、規則性の極めて高いポーラスフィルムを作成することができたことがわかった。

#### 【0027】実施例2 ハニカム様構造の膜の作成(2)

膜となる物質として化合物2からなる両親媒性ポリアクリルアミドを用い、キャストする溶媒をクロロホルム、ベンゼン、トルエン、キシレンと変え、溶液濃度を1.0g/L、キャスト量を30μLとし、キャストさせる基板にガラスを用い、高湿度空気の流量を0.09L/分にし、相対湿度を85%にし、温度を20℃にしたと

きに作成できる膜の溶媒依存を評価した。このときの形態観察結果を図1に示す。図1において、孔径は、上から0.5 $\mu\text{m}$ ~10 $\mu\text{m}$ である。

#### 【0028】実施例3 ハニカム様構造の膜の作成 (3)

膜となる物質として化合物1からなるポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンと化合物2からなる両親媒性ポリアクリルアミドを重量比で10:1の割合で用い、溶媒としてクロロホルムを用い、溶液濃度を10.0g/Lにし、キャストする量を5、10、20mLと変え、キャストさせる基板にガラスを用い、高湿度空気の流量を2.0L/分にし、相対湿度を30%にし、温度を20℃にしたときに作成できる膜のキャスト量依存を評価した。このときの形態観察結果を図2に示す。図2において、孔径は、上から8 $\mu\text{m}$ ~35 $\mu\text{m}$ である。

#### 【0029】実施例4 ハニカム様構造の膜の作成 (4)

膜となる物質として化合物1からなるポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンと化合物2からなる両親媒性ポリアクリルアミドを重量比で10:1の割合で用い、溶媒としてクロロホルムを用い、溶液濃度を1、5、10、20g/Lと変え、キャスト量を10mLとし、キャストさせる基板にハイドロゲルを用い、高湿度空気の流量を2.0L/分にし、相対湿度を30%にし、温度を20℃にしたときに作成できる膜の溶液濃度依存を評価した。このとき

の形態観察結果を図3に示す。図3において、孔径は、最小15 $\mu\text{m}$ 、最大25 $\mu\text{m}$ である。

#### 【0030】実施例5 ハニカム様構造の膜の作成 (5)

膜となる物質として化合物1からなるポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンを用い、溶媒としてクロロホルムを用い、溶液濃度を1.0g/Lとし、キャスト量を5mLとし、キャストさせる基板をアガロースゲル、ガラス、マイカ、PHEMAと変え、高湿度空気の流量を2.0L/分にし、相対湿度を30%にし、温度を20℃にしたときに作成できる膜のキャスト基板依存を評価した。このときの形態観察結果を図4に示す。図4において、孔径は、最小7 $\mu\text{m}$ 、最大14 $\mu\text{m}$ である。

【0031】なお、図1~図4において、バーの長さはすべて20 $\mu\text{m}$ である。

#### 【0032】実施例6 濾過性能の評価 (1)

作成したハニカム様の構造の膜の血液濾過性能を評価するに先立ち、粒径が既知のポリスチレン粒子の通過実験を行い、孔径を変えることによって通過する粒子の種類と通過率を調べた。結果を表1に示す。孔径5.5~8.5 $\mu\text{m}$ の膜を用いると、直径3 $\mu\text{m}$ の粒子は通過するが直径10 $\mu\text{m}$ 以上の粒子は全く通過しないことを初めて明らかにすることができた。

#### 【0033】

【表1】

ポリスチレン粒子の通過率 膜の孔径依存

孔径 [ $\mu\text{m}$ ]	ポリスチレン粒子の通過率 [%]		
	粒径3 $\mu\text{m}$	粒径10 $\mu\text{m}$	粒径20 $\mu\text{m}$
5.5	60.1	0.0	0.0
8.5	98.6	0.0	0.0
11.5	99.6	5.2	0.0
17.5	100	79.8	0.0
25.5	100	97.7	43.2

粒子濃度 3 $\mu\text{m}$ : 1.6 $\times 10^7$ 個/mL

10 $\mu\text{m}$ : 1.1 $\times 10^6$ 個/mL

20 $\mu\text{m}$ : 1.8 $\times 10^7$ 個/mL

粒子通過率は、パーティクルカウンターで計測。

#### 【0034】実施例7 濾過性能の評価 (2)

作成したハニカム様の構造の膜を用いて、ヒト全血中の白血球の捕捉実験を行った。孔径5.2 $\mu\text{m}$ 、9.8 $\mu\text{m}$ の膜を用い、ヘパリン採血管で採血した人全血を濾過させ、血球計算板に血液をキャストして白血球の数を計測したところ、濾過前では4800個/ $\mu\text{L}$ あった白血球数が、濾過後は0個/ $\mu\text{L}$ になっていることがわかった(表2)。また、濾過した濾液を3000回転で10分遠心分離して得られた上清の色を目視で確認したところ、溶血は確認されなかった。

#### 【0035】

【表2】

白血球の捕捉能

孔径[ $\mu\text{m}$ ]	白血球の通過率
5.5	0%
8.5	0%

濾過前の白血球数4800個/ $\mu\text{L}$

#### 【0036】実施例8 濾過性能の評価 (3)

作成したハニカム様の構造の膜を用いて、ヒト全血中の赤血球の捕捉実験を行った。孔径3.5~5.5 $\mu\text{m}$ の膜を用い、各々直径5mmに3枚打ち抜いて積層してニトロセルロース膜の上に静置した。ヘパリン採血管で採血したヘマトクリット値40%のヒト全血を、同一全血を遠心分離して得られた血漿で希釈してヘマトクリット値2.5%に調製した全血にしたものを、積層した膜の上に5 $\mu\text{L}$ 点着して10秒間放置し、その後に積層した膜を持ち上げ、濾過されてニトロセルロース膜に転写した血漿に赤血球の赤い色が残存しているかどうかの評価を行ったところ、孔径が3.5 $\mu\text{m}$ の膜で赤い色が見と

められず、赤血球を捕捉できていることが確認できた  
(表3)。

【0037】

【表3】

赤血球の捕捉能

孔径[ $\mu\text{m}$ ]	転写した濾液の赤色味	赤血球捕捉の判定
3.5	赤色なし	○
4.0	赤色	×
4.2	赤色	×
5.5	赤色	×
4.5	赤色	×
4.5	赤色	×

【0038】

【発明の効果】本発明により、微量の全血から、血清あるいは血漿と血球を分離し、さらには白血球のみを捕捉して分離することができる。

【図面の簡単な説明】

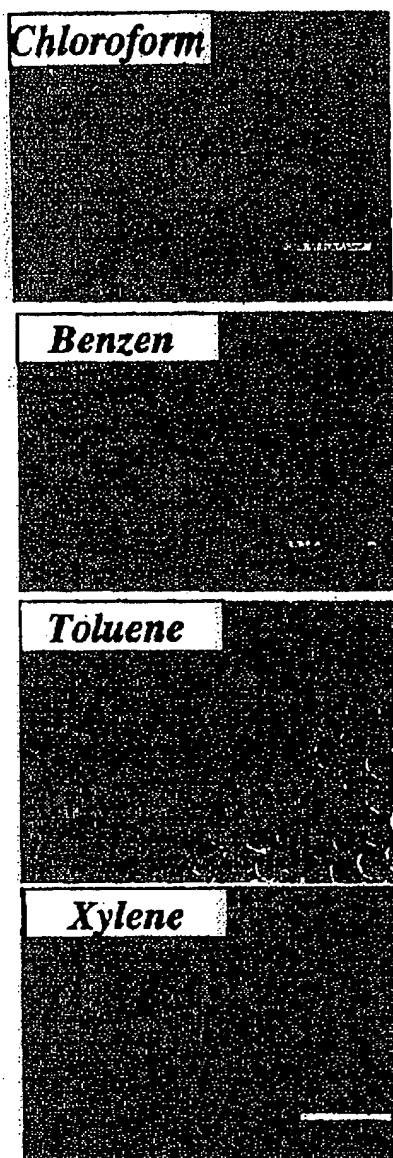
【図1】 ハニカム様の膜を作成するときの孔径の溶媒依存を示したものである。

【図2】 ハニカム様の膜を作成するときの孔径のキャスト量依存を示したものである。

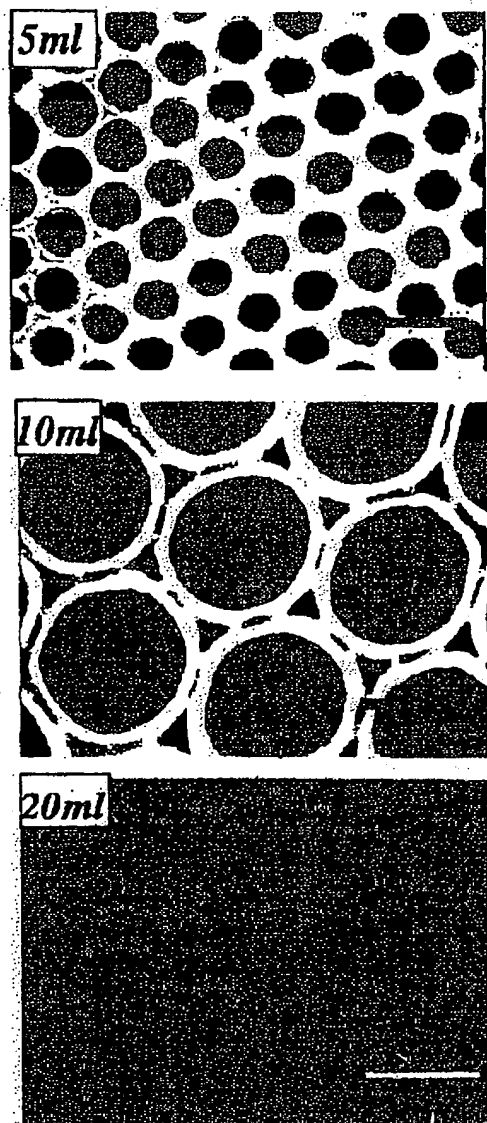
【図3】 ハニカム様の膜を作成するときの孔径の濃度依存を示したものである。

【図4】 ハニカム様の膜を作成するときの孔径のキャストする基板依存を示したものである。

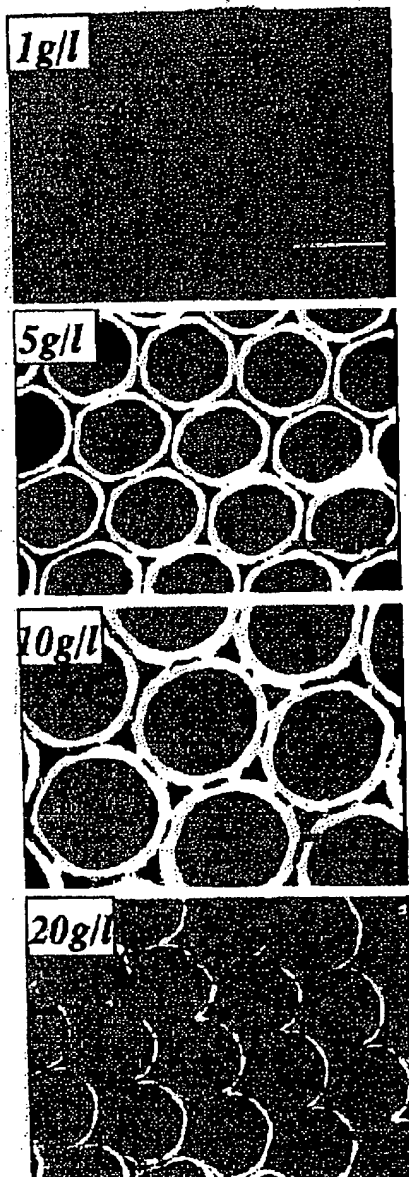
【図1】



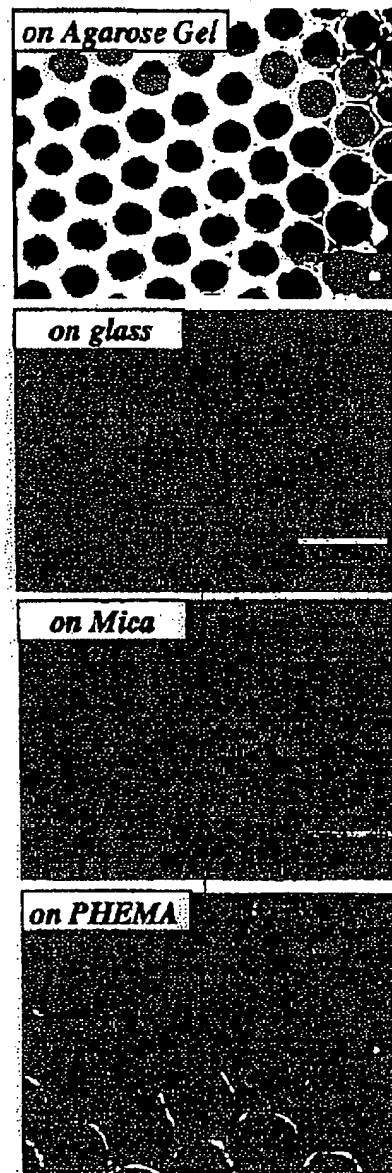
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

B 0 1 D 69/12

71/48

G 0 1 N 33/48

F I

テ-マ-ド (参考)

B 0 1 D 69/12

71/48

G 0 1 N 33/48

H

(72)発明者 境野 佳樹

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写  
真フィルム株式会社内

(72)発明者 伊藤 敏古

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写  
真フィルム株式会社内

BEST AVAILABLE COPY

!(8) 003-149096 (P2003-ch'u96

(72)発明者 寺島 薫

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写

真フィルム株式会社内

Fターム(参考) 2G045 CA25 HA06 HA14 JA07

2G052 AA30 AD26 CA40 EA03 EA11

JA16

4C077 AA12 BB02 EE01 KK11 LL02

LL13 NN02 PP13 PP15

4D006 GA02 GA13 MA04 MA08 MA22

MB06 MC48X MC54X NA10

NA34 NA41 PB44 PB45 PC41

PC80



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**